

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

KERATIN FRAGMENT AND ITS PRODUCTION

Patent Number: JP6116300
Publication date: 1994-04-26
Inventor(s): YAMAUCHI KIYOSHI
Applicant(s): SEIWA KASEI:KK; others: 01
Requested Patent: ☐ JP6116300
Application Number: JP19920296482 19921007
Priority Number(s):
IPC Classification: C07K15/20 ; C07K3/10 ; C12P21/06
EC Classification:
Equivalents:

Abstract

PURPOSE: To provide a keratin fragment having suitable-length peptide chains and cross-linkable thiol groups, therefore, capable of forming a film or a fiber exhibiting a suitable strength and suitable for a raw material of a film, a fiber, a sponge, etc., a wall material of a microcapsule, a base material of agricultural and medical drugs and a base material of cosmetics.

CONSTITUTION: A keratin-containing substance is reduced and the resultant reduced keratin is hydrolyzed in the presence of a protease. During the hydrolysis, the protease is deactivated or separated out of the reactional system to stop the hydrolysis. The degree of hydrolysis is thereby controlled, thus producing the objective keratin fragment having 3000 to 30000 average molecular weight and containing cysteine residues in an amount of 4 to 16 based on 100 amino acid residues.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-116300

(43)公開日 平成6年(1994)4月26日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 15/20		8517-4H		
3/10		8517-4H		
C 1 2 P 21/06		8214-4B		

審査請求 未請求 請求項の数6(全 7 頁)

(21)出願番号 特願平4-298482

(22)出願日 平成4年(1992)10月7日

(71)出願人 000147213

株式会社成和化成

大阪府東大阪市布市町1丁目2番14号

(71)出願人 592005788

山内 清

大阪府河内長野市北青葉台27-19

(72)発明者 山内 清

大阪府河内長野市北青葉台27-19

(74)代理人 弁理士 三輪 鐵雄

(54)【発明の名称】 ケラチンフラグメントおよびその製造方法

(57)【要約】

【目的】 フィルム、繊維などに加工した場合に好適な強度を持ち得るようになる適度な長さのペプチド鎖と架橋可能なチオール基を有し、フィルム、繊維、スポンジなどの材料として、あるいはマイクロカプセルの壁材、医薬薬基材、化粧品基材として、好適に使用できるケラチンフラグメントを提供する。

【構成】 ケラチン含有物質を還元して得られた還元ケラチンを蛋白質分解酵素で加水分解し、その加水分解中に蛋白質分解酵素を失活させるかまたは反応系外に分離して、加水分解を停止させ、加水分解の程度を制限して、平均分子量3,000~30,000でアミノ酸100残基当りシステインを4~16個有するケラチンフラグメントを製造する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 平均分子量3,000～30,000で、アミノ酸100残基当りシステインを4～16個有するケラチンフラグメント。

【請求項2】 ケラチン含有物質を還元して得られた還元ケラチンを蛋白質分解酵素で加水分解し、その加水分解中に蛋白質分解酵素を失活させるかまたは反応系外に分離して、加水分解を停止させ、加水分解の程度を制限することを特徴とする請求項1記載のケラチンフラグメントの製造方法。

【請求項3】 蛋白質分解酵素を禁止剤により失活させる請求項2記載のケラチンフラグメントの製造方法。

【請求項4】 蛋白質分解酵素を加熱により失活させる請求項2記載のケラチンフラグメントの製造方法。

【請求項5】 蛋白質分解酵素をポリマーに担持させた固定化蛋白質分解酵素を用い、該固定化蛋白質分解酵素を遠心分離または濾過により反応系外に分離する請求項2記載のケラチンフラグメントの製造方法。

【請求項6】 蛋白質分解酵素をポリマーに担持させた固定化蛋白質分解酵素を用い、該固定化蛋白質分解酵素をカラムに充填し、該カラムに還元ケラチン水溶液を通過させ、通過の間のみ加水分解して、加水分解中に固定化蛋白質分解酵素を反応系外に分離する請求項2記載のケラチンフラグメントの製造方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

【産業上の利用分野】本発明は、平均分子量3,000～30,000で、活性なチオール基(SH基)を有し、たとえばフィルム、スポンジ、マイクロカプセル、繊維、医薬品基材、化粧品基材などの産業用品の製造に好適に使用されるケラチンフラグメント(ケラチン蛋白断片)およびその製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】毛髪、獣毛、羽毛などの動物組織中に構造タンパクとして存在するケラチンは、従来から、フィルム、繊維などの産業素材原料として注目されてきた。

【0003】そして、これらのケラチンは、天然のケラチン含有物質を酸、アルカリまたは酵素などにより加水分解して短分子量化した加水分解物の水溶液として利用するか、あるいは還元剤と尿素などの蛋白質変成剤との共用によりケラチンのジスルフィド結合をチオール基に還元開裂して生成した還元ケラチンの水溶液として利用するか、あるいは上記の還元ケラチンのチオール基の再結合防止のためにモノヨード酢酸や亜硫酸ナトリウム/テトラチオン酸ナトリウムなどにより不可逆的な化学修飾を施したケラチン誘導体の水溶液として利用するか、あるいは還元開裂と蛋白質分解酵素により短分子量化したケラチン加水分解物の水溶液などとして利用されてきた。

【0004】上記のように、ケラチンは天然ケラチンの

分子量をほぼ維持したままの状態であんなかの加工を経て利用されるか、あるいは化学的または酵素による加水分解処理によって分子量1,000～2,000のものを実質的な成分とする短分子量化ケラチン加水分解物としてかなりの水溶性を付与した上で、化粧品基材などに利用されてきた。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、従来のケラチンやケラチン加水分解物はチオール基がジスルフィド基に酸化されたり不可逆的な化学修飾が施されているため、活性なチオール基に特有な反応性を充分に利用することができなかつたり、あるいは分子量が小さいためにフィルムなどに加工したときに強度が劣り、水中ではすぐ崩壊するなどの欠点があった。

【0006】したがって、本発明は、天然ケラチンよりも低分子量ではあるが、蛋白質分子としての性質(フィルム、繊維などに加工した場合の強靱性)を有する適度な長さのペプチド鎖と架橋反応が可能なチオール基を有するケラチンフラグメントおよびその製造方法を提供することを目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者は、上記目的を達成するために鋭意研究を重ねた結果、ケラチン含有物質を還元して得られた還元ケラチンを蛋白質分解酵素で加水分解し、その加水分解中に蛋白質分解酵素を失活させるかまたは反応系外に分離することによって、加水分解を停止させ、加水分解の程度を制限するときは、平均分子量3,000～30,000(好ましくは平均分子量7,000～30,000)で、アミノ酸100残基当りシステインを4～16個有するケラチンフラグメントが得られることを見出し、本発明を完成するにいたった。

【0008】上記ケラチンフラグメントは、平均分子量が3,000～30,000と、従来の短分子量化したケラチン加水分解物に比べて分子量が大きく、蛋白質分子としての性質を保持する適度な長さのペプチド鎖を有しているので、フィルム、繊維などに加工した場合に望ましい強度が得られる。

【0009】また、上記のケラチンフラグメントは、アミノ酸100残基当りシステインを4～16個有しており、そのシステイン残基がチオール基を有しているので、そのチオール基間の架橋反応により高分子化することができる。

【0010】すなわち、このチオール基を空気酸化により架橋するか、あるいは過酸化水素や過ヨウ素酸ソーダなどの酸化剤により架橋してジスルフィド結合を生成させることによって、架橋剤を使用しなくても高分子化することができ、フィルム、スポンジ、マイクロカプセルなどの基材として十分な強度を持たせることができる。

【0011】上記平均分子量3,000～30,000

で、アミノ酸100残基当りシステインを4~16個有するセラチンフラグメントを得るにあたって、セラチン含有物質から還元セラチンを得る工程は公知の方法を含め各種の方法を採用することができる。

【0012】そして、還元セラチンから制限的に加水分解して平均分子量3,000~30,000で、アミノ酸100残基当りシステインを4~16個有するセラチンフラグメントを得る工程は、本発明者が本発明の完成にあたって特に開発した方法によるので、これについて先に詳しく説明する。

【0013】すなわち、本発明において、上記平均分子量3,000~30,000で、アミノ酸100残基当りシステインを4~16個有するセラチンフラグメントを得るには、セラチン含有物質を還元して得られた還元セラチンを蛋白質分解酵素で加水分解し、その加水分解中に蛋白質分解酵素を失活させるかまたは反応系外に分離することによって、加水分解を停止させ、加水分解の程度を制限する。

【0014】この還元セラチンの加水分解にあたって、蛋白質分解酵素としては、ペプチド結合について限られた分解特異性を持つトリプシンやカイモトリプシンが特に好適であるが、これらに限らず、プロメライン、ジスパーゼ (Dispase)、フィチン、パパイン、ペプシン、サーモライシンなどの蛋白質分子の内部ペプチド結合を非特異的に切断するエンドペプチターゼであってもよい。また、固定化トリプシン (Trypsin-30, Beohringer Mannheim, Cat. No. 109851) などのように蛋白質分解酵素をポリマーに担持させた固定化蛋白質分解酵素なども用いることができる。

【0015】還元セラチンの加水分解そのものは(つまり、加水分解中に加水分解を停止させて、加水分解の程度を制限することを除いては)、特に限定されることはないが、たとえば、還元セラチンを水溶液にし(還元セラチンの濃度にして1~5重量%が好ましい)、この還元セラチンの水溶液を5~80℃、好ましくは20~50℃に保持しながら、蛋白質分解酵素を加え、攪拌することによって行われる。

【0016】還元セラチンを蛋白質分解酵素で制限することなく加水分解していくと、得られる加水分解物は分子量がどんどん低下していくので、その加水分解中に蛋白質分解酵素を失活させるかまたは反応系外に分離することによって、加水分解を停止させ、加水分解の程度を制限する。

【0017】その際の蛋白質分解酵素の失活にあたっては、蛋白質分解酵素の禁止剤を使用するか、加熱するかいずれかが採用される。

【0018】上記蛋白質分解酵素の禁止剤としては、それぞれの蛋白質分解酵素に適した禁止剤があり、トリプシン、カイモトリプシンなどや上記のエンドペプチター

ゼには、たとえばアンチトリプシン、トリプシニンヒビター、アプロチニン、リュベプチン (Leupeptin)、マクログロブリンなどが用いられる。

【0019】また、加熱により蛋白質分解酵素を失活させる場合は、たとえば、加水分解中の反応液を急速に加熱して沸騰させればよい。

【0020】一方、蛋白質分解酵素を反応系外に分離することによって、加水分解を停止させ、加水分解の程度を制限する方法を採る場合には、固定化蛋白質分解酵素を使用するのが好ましい。

【0021】すなわち、還元セラチンの水溶液に固定化蛋白質分解酵素を加え、加水分解し、その加水分解中に遠心分離または濾過により、その固定化蛋白質分解酵素を反応系外に分離することによって、加水分解を停止させ、加水分解の程度を制限して、平均分子量3,000~30,000のセラチンフラグメントを得ることができる。

【0022】また、加水分解中に蛋白質分解酵素を分離する方法を採用する場合には、上記のように還元セラチンの水溶液に固定化蛋白質分解酵素を加える方法とは異なり、固定化蛋白質分解酵素そのもの、または固定化蛋白質分解酵素を分子ふるいの役目を果たすゲル(たとえば、Sephadex G-100)と共にカラムに充填し、そのカラムに還元セラチンの水溶液を通過させ、その通過の間のみ加水分解させ、還元セラチンの加水分解中に蛋白質分解酵素を反応系外に分離させる方法も採用することができる。

【0023】なお、市販品の蛋白質分解酵素や固定化蛋白質分解酵素の活性は、バッチごとに変動し一定品質のものが入手しにくいので、加水分解処理液をSDS(ドデシル硫酸ナトリウム)ポリアクリルアミド電気泳動法で分析し、セラチン原料(分子量40,000~60,000が主)の泳動パターンから分子量40,000~60,000の主蛋白バンドが消失し、加水分解物の主バンドの分子量がほぼ10,000~30,000と認められる時点を目安とし、最適な最終酵素処理ユニット量と処理時間、固定化蛋白質分解酵素量および該固定化蛋白質分解酵素と還元セラチン水溶液との接触時間あるいは滞留時間を決定することが望ましいが、酵素使用量は、通常、還元セラチン20mg/ml当り100~3,000ユニットの範囲から選ばれ、処理時間は、通常、3~30分の範囲から選ばれる。

【0024】つぎに、上記の制限加水分解工程で使用する還元セラチンを得るまでの還元工程について詳しく説明する。

【0025】セラチン含有物質を還元して還元セラチンを得る方法としては、公知の方法を含め各種の方法を採用できる。それらのうち、代表的なものを例示すると、たとえば次の①~②に示すものが挙げられる。

【0026】① セラチン含有物質を水性媒体中、蛋白

質変成剤の存在下、または蛋白質変成剤と界面活性剤の存在下で、還元剤で還元し、不溶物を遠心分離または濾過により除去した後、得られた水溶液に塩化ナトリウムや硫酸アンモニウムなどの無機塩を添加して塩析させ、抽出された還元ケラチンを沈殿させて、還元ケラチンを単離する。

【0027】② ケラチン含有物質を水性媒体中、蛋白質変成剤と界面活性剤の存在下で、還元剤で還元し、抽出された還元ケラチンを透析によって単離する。

【0028】上記①、②の方法とも、還元時に超音波を照射して、還元抽出を促進させることができる。

【0029】上記①、②の方法とも、本発明者が開発したものであるが、特に①の方法による場合、短時間でかつ収率よく還元ケラチンを単離することができ、本発明の実施にあたって好適に適用できるので、それについて詳しく説明する。

【0030】上記①の方法では、還元ケラチンを製造するにあたっては、まずケラチン含有物質を水性媒体中、蛋白質変成剤の存在下、または蛋白質変成剤と界面活性剤の存在下で、還元剤で還元する。

【0031】上記の還元工程で出発原料として用いるケラチン含有物質としては、ケラチンを含むものであればよく、たとえば人間の毛髪、羊毛、馬毛、牛毛などの獣毛や、鶏などの鳥類の羽毛、牛などの動物の爪や角、ひずめ（蹄）、うろこ（鱗）などを用いることができる。

【0032】上記の水性媒体は、水単独、または水と水混和性の有機溶媒との混合物であってもよく、含水率が50重量%以上、好ましくは80重量%以上の溶媒を用いる。水混和性の有機溶媒としては、たとえばメタノール、エタノールなどの低級脂肪族アルコールなどが挙げられる。

【0033】還元剤は、ケラチン含有物質中のケラチンのジスルフィド結合を還元してチオール基に変換する作用をするものであり、この還元剤としては、たとえば2-メルカプトエタノール、チオグリコール酸、ジチオスレイトール、ジチオエリトリールなどのチオール化合物；トリプロピルホスフィン、トリブチルホスフィンなどの有機リン化合物；亜硫酸水素ナトリウムなどの還元能力を持つ無機化合物などが用いられる。

【0034】これらの還元剤の使用量は、ケラチン含有物質10gに対して0.05～0.50モルであり、還元反応の効率と経済性を考慮すると、ケラチン含有物質10gに対して0.05～0.20モルが好ましい。

【0035】蛋白質変成剤は、ケラチン中の水素結合を切断する作用を有するもので、その具体例としては、たとえば尿素、チオ尿素などが好適なものとして挙げられる。そして、爪、ひずめ、うろこなどのように堅い組織のケラチン含有物質を使用する場合には、蛋白質に対して溶解作用を有する水酸化ナトリウム、アンモニアなどを溶解助剤として用いることが好ましい。

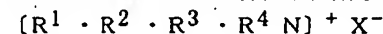
【0036】これらの蛋白質変成剤の濃度と使用量は、ケラチン含有物質の溶解性などを考慮して決定するのが適しているが、通常、ケラチン含有物質に対して3～10mol/l濃度のものを5～40倍重量、好ましくは5～8mol/l濃度のものを10～30倍重量である。

【0037】還元工程は、上記のような蛋白質変成剤の存在下、または蛋白質変成剤と界面活性剤の存在下で行われるが、後者のように界面活性剤を共存させた場合は、還元速度が速くなり、ケラチン含有物質からの還元ケラチンの抽出速度が向上する。ただし、界面活性剤は還元ケラチンを可溶化する作用があるので、塩析のために添加する無機塩を多くする必要がある。

【0038】上記界面活性剤としては、下記のアニオン界面活性剤、カチオン界面活性剤、両性界面活性剤、ノニオン界面活性剤のいずれも用いることができる。

【0039】アニオン界面活性剤としては、たとえばドデシル硫酸ナトリウムなどのアルキル硫酸塩、アルキル硫酸エステル塩、脂肪酸アルコールリン酸エステル塩、スルホコハク酸エステル塩などのアニオン界面活性剤などが挙げられる。

【0040】カチオン界面活性剤としては、たとえば次式で示されるカチオン界面活性剤などが挙げられる。



〔式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 および R^4 の1個または2個は直鎖もしくは分岐鎖を有する炭素数8～20のアルキル基またはヒドロキシアルキル基であり、残余は水素原子、炭素数1～3のアルキル基もしくはヒドロキシアルキル基またはベンジル基である。Xはハロゲン原子、炭素数1～2個のアルキル硫酸基またはアルキルピリジニウムハライドなどの芳香族四級アミン塩などである〕。

【0041】両性界面活性剤としては、たとえば脂肪族アミンのN-カルボキシメチル体、N-スルホアルキル化体、イミダゾリンスルホン酸などのベタイン系の両性界面活性剤（疎水基は主として炭素数12～14のアルキル基またはアシル基、対イオンはアルカリ金属などである）などが挙げられる。

【0042】ノニオン界面活性剤としては、たとえばポリオキシエチレンアルキルエーテル型、脂肪酸エステル型、ポリエチレンイミン型、ポリグリセリンエーテル型、ポリグリセリンエステル型などのノニオン界面活性剤（疎水基は主として炭素数12～14のアルキル基もしくはアシル基である）などが挙げられる。

【0043】そして、この界面活性剤の還元工程での使用量はケラチン含有物質の5～50重量%が好ましい。

【0044】界面活性剤としては、前記したように、アニオン界面活性剤、カチオン界面活性剤、両性界面活性剤、ノニオン界面活性剤のいずれも使用することができるが、なかでもアニオン界面活性剤、たとえばアルキル硫酸塩やポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩な

どが特に好ましい。

【0045】この還元工程の具体的操作は、たとえば次のようにして行われる。すなわち、ケラチン含有物質をその全量が浸るに充分な5~40重量倍の3~10M

(mol/l)の蛋白質変成剤の水溶液、たとえば尿素の場合には、5~8Mの尿素水溶液に浸漬し、還元剤または還元剤と界面活性剤を加えてから容器を密栓し、室温~100℃で1~24時間加熱撹拌する。

【0046】上記還元工程において、反応系に超音波を照射すると、還元抽出作用を促進することができ、還元工程に要する時間を短縮することができる。超音波照射はプローブ型、浴槽型などの公知の超音波照射装置を用いることができる。超音波照射の強さは反応系の大きさにより異なるが、たとえば反応系の大きさが1リットル以下のときは出力50~200Wで充分である。

【0047】上記の還元工程を経て得られた反応液は、不溶物を含むので、これを遠心分離や濾過により除去した後、塩析により還元ケラチンを沈殿させる。

【0048】塩析は、塩化ナトリウム、硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウムなどの無機塩を上記不溶物除去後の水溶液に加えることによって行われる。この塩析にあたっては、上記水溶液を塩酸などの酸を加えて弱酸性(pH3~5、特に3.5付近が好適)にしておくことが好ましい。また、アセトンやメタノール、エタノールなどの極性有機溶媒を併用添加し、塩析効果を上げてよい。

【0049】この塩析にあたっての無機塩の添加量はケラチン素抽出液(キューティクルなどの不溶物を除去したもの)に対して無機塩が0.1~2Mの濃度になるようにすることが適しており、特に0.5~0.7Mの濃度になるようにすることが好ましい。

【0050】塩析時の温度は0℃近辺から40℃の範囲であり、塩析に要する時間は短時間で、長くても10分間程度をみておけば充分である。

【0051】上記のようにして固形物として得られた還元ケラチンは、水洗後、水を加えて水溶液にすることができる。

【0052】上記の還元工程で生じる現象およびこの①の方法が還元ケラチンを得るにあたって優れたものである理由を述べると、次の通りである。

【0053】まず、ケラチン含有物質を水性媒体中で還元すると、ケラチンは還元されて水性媒体中に溶解し、ケラチンを包んでいたキューティクルなどは不溶物として水性媒体中に存在する。

【0054】そこで、この不溶物を遠心分離または濾過により除去した後、塩化ナトリウムや硫酸アンモニウムなどの無機塩を添加すると塩析が生じ、水性媒体中に溶解していた還元ケラチンが還元された状態を保持したまま、つまりケラチンを還元したときに生成したチオール基がほぼ保持された状態で、溶液中から高収率で沈殿す

る。

【0055】一方、還元剤、蛋白質変成剤、界面活性剤などは、水性媒体中に溶解して水性媒体中に残るので、濾過または遠心分離することにより還元ケラチンを反応液から単離することができる。

【0056】この際、還元ケラチンは、水性媒体中から短時間で沈殿するので、長時間を要する透析や限外濾過による場合のように還元ケラチンが酸化を受けることが少なく、したがってチオール基がほとんど損なわれることなく保持される。

【0057】上記のような還元工程とそれに続く制限加水分解工程を経て得られたケラチンフラグメントの水溶液は、そのままの状態を利用することができるし、凍結乾燥して粉末として利用に供することができる。また、限外濾過により濃縮液として利用することも可能である。

【0058】そして、得られるケラチンフラグメントは、前記のような制限加水分解によって平均分子量3,000~30,000のものとすることができる。

【0059】また、アミノ酸分析によれば、得られるケラチンフラグメント中のシステインは原料のケラチン含有物質中に含まれているケラチンを還元したときに生成したシステインとほぼ同様の割合で存在し、アミノ酸100残基当り4~16個のシステインを有している。

【0060】また、上記②の方法によって還元工程を実施する場合も、前記①の方法と共通する部分は①の方法と同様に行うことができる。

【0061】そして、②の方法における透析処理は従来公知の処理手段によって行うことができる。たとえば、還元後に不溶物を除いた反応液、すなわち、還元ケラチンを含む濾過液をたとえばセロハンのような半透膜の容器内に入れ、これを外液を入れた容器内に浸す。外液としては、ジスルフィド結合をチオール基に還元することができる還元剤を0.1~0.5重量%含む水性媒体を用いることができ、たとえば上記還元工程で用いた水性媒体と還元剤の混合物を用いることができる。外液は還元ケラチンの濾過液に対し通常20~40容量倍用いられる。温度は室温でよく、時間は通常12~36時間である。このような透析処理を2~4回行うことにより上記濾過液中の蛋白質変成剤、界面活性剤などを除くことができると共に、還元剤を外液と等濃度に減らすことができる。

【0062】還元ケラチンを入手して制限加水分解することも可能であるが、そのような還元ケラチンもケラチン含有物質を還元して得られたものであるから、その場合も、もちろん、本発明の範囲内に含まれる。

【0063】

【実施例】つぎに、実施例を挙げて本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はそれらの実施例のみに限定されるものではない。

【0064】実施例1

羊毛 (Collidale種より採取) 20gを5M尿素水溶液550gに浸漬し、2-メルカプトエタノール25mlを添加した後、容器を密栓、攪拌し、約50℃で5時間、200Wの出力にて超音波照射した。反応液を室温に戻し、不溶物を濾過により除去した後、濾液を塩酸でpH5に調整し、その後、硫酸ナトリウムを添加して塩析し、密栓、攪拌した後、遠心分離した。

【0065】得られた白色沈殿物を2-メルカプトエタノールを0.3重量%含む水で水洗し、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 3gと2-メルカプトエタノール0.6gを含む水を加え、アンモニアでpH8~9に調整しつつ、溶解した。

【0066】この水溶液10gをLowry法により蛋白定量したところ、0.35gの還元ケラチンを含んでおり、この水溶液中の還元ケラチン濃度は3.5重量%であって、収率は35%であった。また上記水溶液を凍結乾燥して得た還元ケラチン粉末のアミノ酸分析を行ったところ、アミノ酸100残基当りシステインが8.4個であった。

【0067】また、上記還元ケラチン粉末の分子量をSDSポリアクリルアミド電気泳動法で調べたところ、分子量40,000から60,000のものが主たる成分であった。

【0068】上記のようにして得られた濃度3.5重量%の還元ケラチン水溶液10mlを20℃に保ちながら、その中にトリプシン2,000ユニットを含む0.05Mのトリス/塩酸緩衝液 (pH8) 5mlと0.01Mの塩化カルシウム水溶液5mlを加え、窒素ガス雰囲気下で5分間攪拌した。

【0069】つぎに、1.5mgユニットのアンチトリプシン (antitrypsin、シグマ社製、商品番号A9024) 水溶液を添加してトリプシンを失活させ、加水分解を停止させて、加水分解の程度を制限した。

【0070】得られた加水分解液中のケラチンフラグメントの分子量をSDSポリアクリルアミド電気泳動法で調べたところ、ケラチンフラグメントは分子量8,000~24,000のものを主成分とする混合物であり、その数平均での平均分子量は17,000であった。

【0071】上記加水分解液についてLowry法により蛋白定量したところ、ケラチンフラグメントの濃度は3.5重量%であった。また、アミノ酸分析によれば、上記ケラチンフラグメントはアミノ酸100残基当りシステインを8.4個有していた。

【0072】実施例2

実施例1における還元工程で得られた還元ケラチン水溶液 (3.5重量%) 50mlを20℃に保ちながら、その中にトリプシン8,000ユニットを含む0.05Mのトリス/塩酸緩衝液 (pH8) 25mlと0.01M

の塩化カルシウム水溶液25mlを加え、窒素ガス雰囲気下にて15分間攪拌した。

【0073】について、上記反応液を加熱して3分間沸騰させ、トリプシンを失活させ、加水分解を停止させて、加水分解の程度を制限した。

【0074】以後、実施例1と同様の操作を経て得られた還元ケラチン加水分解液中のケラチンフラグメントの分子量をSDSポリアクリルアミド電気泳動法によって調べたところ、ケラチンフラグメントは分子量7,000~24,000のものが主成分であり、平均分子量は16,000であった。

【0075】上記還元ケラチン加水分解液についてLowry法により蛋白定量したところ、ケラチンフラグメントの濃度は3.5重量%であった。また、アミノ酸分析によれば、上記ケラチンフラグメントはアミノ酸100残基当りシステインを8.5個有していた。

【0076】実施例3

実施例1における還元工程で得られた還元ケラチン水溶液 (3.5重量%) 50mlと0.01Mの塩化カルシウム水溶液50mlの混合物をpH7.8~8.5に調整したのち20℃に保ちながら、その中に固定化トリプシン (Trypsin-30, Boehringer Mannheim, Cat. No. 109851) 8,000ユニットを加え、窒素ガス雰囲気下にて20分間攪拌した後、遠心分離によりただちに固定化トリプシンを分離し、加水分解を停止させて、加水分解の程度を制限した。

【0077】以後、実施例1と同様の操作を経て得られた還元ケラチン加水分解液中のケラチンフラグメントの分子量をSDSポリアクリルアミド電気泳動法によって調べたところ、ケラチンフラグメントは分子量8,000~30,000のものが主成分であり、平均分子量は19,000であった。

【0078】上記還元ケラチン加水分解液についてLowry法により蛋白定量したところ、ケラチンフラグメントの濃度は3.5重量%であった。また、アミノ酸分析によれば、上記ケラチンフラグメントはアミノ酸100残基当りシステインを8.5個有していた。

【0079】実施例4

固定化トリプシン (Trypsin-30, Boehringer Mannheim, Cat. No. 109851) とゲル [Sephadex G-100 (course)] をリン酸緩衝液 (pH8) 中で体積比1:30で混合し、得られた混合物をガラスカラム (直径2cm、高さ10cm) に充填した。

【0080】このカラムに実施例1における還元工程で得られた還元ケラチン水溶液 (3.5重量%) 20mlと0.01Mの塩化カルシウム水溶液10mlとの混合物を室温で25分間かけて流し、還元ケラチン水溶液が上記カラムを通過する間、加水分解した。

【0081】得られた還元ケラチン加水分解液中のケラチンフラグメントの分子量をSDSポリアクリルアミド電気泳動法により測定したところ、上記加水分解液中のケラチンフラグメントは分子量7,000~30,000のものが主成分であり、平均分子量は20,000であった。

【0082】上記還元ケラチン加水分解液についてLowry法により蛋白定量したところ、ケラチンフラグメントの濃度は1.8重量%であった。また、アミノ酸分析によれば、上記ケラチンフラグメントはアミノ酸100残基当りシステインを8.1個有していた。

【0083】比較例1

実施例1における還元工程で得られた還元ケラチン水溶液(3.5重量%)50mlを20℃に保ちながら、その中にトリプシン8,000ユニットを含む0.05Mのトリス/塩酸緩衝液25mlと0.01Mの塩化カルシウム水溶液25mlとの混合物を加え、窒素ガス雰囲気下で3時間攪拌して還元ケラチンを加水分解した。

【0084】得られた還元ケラチン加水分解物中のケラチンフラグメントの分子量をSDSポリアクリルアミド電気泳動法で調べたところ、上記ケラチンフラグメントは分子量は1,000~3,000のものが主成分であり、平均分子量は2,000であった。

【0085】また、上記ケラチンフラグメントのアミノ

酸分析をしたところ、上記ケラチンフラグメントはアミノ酸100残基当り7.1個のシステインを有していた。

【0086】試験例1

実施例1~4および比較例1で得られたケラチンフラグメントの水溶液それぞれ6mlに75重量%グリセリン水溶液0.2mlを加え、それらをそれぞれ別々に水平な底面を持つ円形ガラス容器(直径6cm)に流し、室温、大気中で乾燥した。その後、80~90℃で15分間加熱処理した後、水中に入れ、ガラス容器から剥離してきたケラチンフラグメントのフィルムを取り出した。

【0087】得られたフィルムの強伸度をオートグラフにより測定した。その結果を表1に示す。なお、測定にあたっての試料の調整および測定条件は次の通りである。

【0088】試料:

得られたフィルムを風乾した後、80℃で20分間熱処理し、その後、室温まで戻す。

【0089】測定条件:

相対湿度65%の雰囲気中、引張速度200mm/minで測定する。

【0090】

【表1】

フィルム	強 伸 度 (相対湿度65%)
実施例1	0.81kg/mm ²
実施例2	0.85kg/mm ²
実施例3	0.82kg/mm ²
実施例4	0.82kg/mm ²
比較例1	0.30kg/mm ²

【0091】表1に示すように、実施例1~4で製造したケラチンフラグメントから作製したフィルムは、比較例1で製造したケラチンフラグメントから作製したフィルムに比べて、強伸度が大きかった。

【0092】

【発明の効果】以上説明したように、本発明によれば、ケラチン含有物質から得られた還元ケラチンを蛋白質加水分解酵素により制限的に加水分解することによって、平均分子量3,000~30,000でアミノ酸100残基当り4~16個のシステインを有するケラチンフラグメントを得ることができる。

【0093】上記ケラチンフラグメントは、フィルム、

繊維などに加工した場合に好適な強度を持ち得るようになる適度な長さのペプチド鎖と架橋可能なチオール基を有している。

【0094】また、上記ケラチンフラグメントは天然の蛋白質に由来するものであって、人体に対する毒性、刺激性なども少ない。

【0095】したがって、このケラチンフラグメントは、上記の特性を利用して、フィルム、スポンジ、繊維などの材料として、あるいはマイクロカプセルの壁材、医薬基材、化粧品基材として、好適に使用することができる。